

Identifikasi Bakteri Endofit Daun Pegagan (*Centella asiatica*) berdasarkan Penanda Gen 16 S rRNA pada *Escherichia coli*

Mahyarudin¹, Hafrizal Riza²

¹Departemen Mikrobiologi Medik, PSPD FK UNTAN

²Program Studi Farmasi, FK UNTAN

Abstrak

Latar Belakang. Di Indonesia diare masih merupakan masalah kesehatan masyarakat. Tanaman pegagan merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di perkebunan, ladang, tepi jalan, pematangan sawah ataupun di ladang yang telah dilaporkan memiliki kemampuan antidiare. Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan gejala-gejala penyakit. Beberapa jenis bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibiotik. **Metodologi.** penelitian ini merupakan penelitian deskriptif-eksploratif. Isolasi bakteri endofit dari daun pegagan (*C.asiatica* L.) dilakukan dengan metode tanam langsung dan pemurnian isolate dengan metode streak plate, potensi antibakteri diuji dengan metode difusi cakram (*disk diffusion methods*). Identifikasi bakteri endofit dilakukan dengan pengamatan morfologi koloni, morfologi sel dan aktivitas biokimia. **Hasil.** Sebanyak 4 isolat dari 42 isolat bakteri endofit daun pegagan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* yaitu berkisar 2 mm – 6,5. **Kesimpulan.** Isolat 16 memiliki aktivitas yang paling tinggi dibandingkan ketiga isolat lainnya yaitu 6,5 mm.

Kata Kunci: *Centella asiatica* L., Bakteri Endofit, *Escherichia coli*, Antibakteri

Background. In Indonesia diarrhea is still a public health problem. *Centella asiatica* plants are wild plants that grow a lot on plantations, fields, roadside, maturation of fields or in fields that have been reported to have antidiarrheal abilities. Endophytic bacteria are bacteria that live in the tissues of host plants without causing symptoms of disease. Several types of endophytic bacteria are known to produce antibiotic-active compounds.

Method. this research is a descriptive-explorative study. Isolation of endophytic bacteria from *Centella asiatica* (*C.asiatica* L.) leaves was carried out by direct planting method and purification by streak plate method, antibacterial potential was tested by disk diffusion methods. Identification of endophytic bacteria was carried out by colony morphological observation, cell morphology and biochemical activity. **Result.** A total of 4 isolates from 42 isolates of pegagan leaf endophytic bacteria had antibacterial activity against *Escherichia coli* which ranged from 2 mm to 6.5. **Conclusion.** Isolates 16 had the highest activity compared to the other three isolates, which were 6.5 mm.

Keywords: *Centella asiatica* L., Endophytic Bacteria, *Escherichia coli*, Antibacterials

PENDAHULUAN

Diare adalah buang air besar dengan feses yang berbentuk cair atau setengah cair, kandungan air pada feses lebih banyak dari biasanya yaitu lebih dari 200 gram atau 200 ml/24jam.¹ Di negara Indonesia diare masih merupakan masalah kesehatan masyarakat, menurut data dari Kemenkes RI pada tahun 2015 telah terjadi kejadian luar biasa (KLB) di 11 provinsi dengan kasus sebanyak 1.213 penderita dengan angka kematian diare sebanyak 2,47%.² Provinsi Kalimantan Barat khususnya kota Pontianak pada tahun 2015, dilaporkan bahwa angka kejadian diare sebanyak 13.532 kasus dan masih termasuk 10 terbesar penyakit yang dilayani oleh puskesmas.³ Diare disebabkan oleh bakteri, virus, parasit dan lain-lain. Satu diantaranya bakteri penyebab diare adalah bakteri *Escherichia coli*.¹

Tata laksana untuk diare akut adalah dengan rehidrasi cairan, diet, obat diare dan antibiotik.⁴ Antibiotik merupakan obat

yang paling banyak digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi dapat menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik.⁵ Untuk mengatasi infeksi mikroorganisme yang telah resisten terhadap antibiotik dapat menggunakan Tanaman obat sebagai pengobatan alternatif.⁶ Satu diantara tanaman obat tradisional yang memiliki efek pengobatan yaitu tanaman pegagan.

Tanaman pegagan telah di laporkan digunakan untuk pengobatan ulcer lambung, asma, epilepsi, hepatitis, sifilis dan diare.⁷ Tanaman herba ini sering digunakan oleh masyarakat baik dalam bentuk segar, kering maupun dalam bentuk ramuan (jamu). Tanaman ini mengandung berbagai bahan aktif seperti triterpenoid, saponin dan kandungan kimia dari pegagan terbagi menjadi beberapa golongan, yaitu asam amino, flavonoid, terpenoid dan minyak atsiri.⁸ Fungsi lain

dari pegagan antara lain sebagai obat penenang, obat penghilang sakit, *antidepressive* dan antimikrob.⁹ Hasil penelitian terdahulu telah melaporkan bahwa ekstrak metanol dari tanaman pegagan memiliki aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.¹⁰ Pada tanaman terdapat mikroorganisme yang dapat memproduksi metabolit sekunder dengan kemampuan sebagai antibakteri yang disebut bakteri endofit.¹¹

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan gejala-gejala penyakit.¹² Bakteri endofit hidup di dalam jaringan vascular tumbuhan tanpa menyebabkan efek negatif. Hubungan simbiosis mutualisme antara bakteri dan tumbuhan memungkinkan bakteri menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti terkandung di dalam tumbuhan inangnya.¹³ Mikroorganisme endofit dapat ditemukan pada berbagai jaringan

diantaranya biji, ovula buah, batang, akar, umbi akar dan daun.^{14,15} Beberapa jenis bakteri endofit diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif yang bersifat antibiotik.¹⁶

Beberapa bakteri endofit mampu menghasilkan produk potensial yaitu *Streptomyces griseus* dari tanaman *Kandelia candel* menghasilkan asam p-aminoacetophenonic sebagai antimikrob.¹⁷ *Streptomyces* NRRL 30562 dari tanaman *Kennedia nigriscans* menghasilkan munumbicin (antibiotik) dan munumbicin D (antimalaria). *Serratia marcescens* dari tanaman *Rhyncholacis penicillata* menghasilkan oocydin A sebagai antifungi.¹⁸ Endofit yang diisolasi dari suatu tanaman dapat menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan tanaman aslinya.¹⁹ Keuntungan lain yang diperoleh dari pengembangan bakteri endofit adalah dapat menjaga kelestarian tanaman obat, terutama jenis tanaman obat yang langka agar tidak digunakan secara

terus menerus sehingga tidak menurunkan jumlah populasi.

Penelitian mengenai eksplorasi bakteri endofit dari daun pegagan terhadap bakteri *E. coli* hingga saat ini belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti bertujuan untuk melakukan penelitian ini agar dapat diperoleh informasi mengenai bakteri endofit yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* yang merupakan penyebab penyebab diare.

Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L.)

Pegagan merupakan tanaman obat yang dapat dikonsumsi sebagai sayuran. Tanaman obat ini mudah untuk dibudidayakan dan diperbanyak secara vegetatif. Tanaman pegagan merupakan tanaman liar dan habitat aslinya banyak tumbuh di ladang, perkebunan, tepi jalan maupun di pekarangan. Tanaman yang berasal dari Asia tropis ini menyukai tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung. Di Indonesia tanaman ini

tumbuh subur pada ketinggian 100-2500 mdpl.¹² Klasifikasi tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) adalah sebagai berikut:²⁰

Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Superordo	: Asteranae
Ordo	: Apiales
Famili	: Apiaceae
Genus	: <i>Centella</i>
Spesies	: <i>Centella asiatica</i> (L.).

Daun pegagan berwarna hijau, berbentuk seperti kipas atau ginjal. Daun berdiameter 1-7 cm, permukaan dan punggung daunnya licin, tepinya agak melengkung ke atas, bergerigi, dan kadang-kadang berambut. Tulang daun berpusat di pangkal dan tersebar ke ujung.¹²

Pegagan memiliki bunga yang kecil, bentuknya lonjong, cekung, dan runcing ke ujung. Jumlah tangkai bunga antara 1-5 tangkai dengan ukuran sangat pendek, tersusun dalam kerangka seperti payung, berwarna putih sampai merah muda atau agak kemerahan. Kelopak bunga tidak

bercuping serta tajuk bunga berbentuk bulat telur dan meruncing ke bagian ujung. Buah pegagan juga berukuran kecil, panjangnya 2-2,5 mm dan lebar 7 mm, berbentuk lonjong atau pipih, menggantung, baunya wangi, rasanya pahit, berdinding agak tebal, berkulit keras, berlekuk dua, berusuk jelas, dan berwarna kuning.¹²

Pegagan (*C. asiatica* L.) diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder dan hal ini penting dalam sistem pengobatan modern. *C. asiatica* L. telah dilaporkan memiliki kandungan kimia seperti terpenoid, tanin, steroid, alkaloid, saponin dan flavonoid.^{21,22} Secara tradisional tanaman ini banyak digunakan untuk mengobati penyakit kulit. Pegagan (*C. asiatica* L.) juga dapat digunakan untuk mengobati sakit perut, batuk, disentri, penyembuh luka, radang, pegal linu, asma, wasir, tuberculosis, lepra, demam, dan penambah selera makan.²³ Pegagan juga memiliki efek antioksidan yang tinggi, aktifitas anti jamur, dan

aktifitas antimikrob pada 5 bakteri gram positif (*Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus* dan *Sarcina lutea*) dan 8 gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *S. boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio mimicus* dan *Vibrio parahemolyticus*).²⁴

Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup didalam jaringan tanaman seperti akar, batang, daun dan buah tanpa menyebabkan kerugian pada tanaman inangnya.²⁵ Umumnya bakteri endofit dan tanaman inangnya hidup secara bersimbiosis mutualisme. Simbiosis mutualisme antara bakteri endofit dengan tanaman, dalam hal ini bakteri endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan memperoteksi tanaman dalam melawan patogen, sedangkan tanaman mendapatkan derifat atau turunan nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya.²⁶

Bakteri endofit memberikan manfaatnya kepada tanaman inangnya seperti meningkatkan laju pertumbuhan, ketahanan terhadap hama, penyakit, dan kekeringan. Manfaat lain dari bakteri endofit antara lain sebagai agen biokontrol tanaman, antimikroba, anti kanker, antioksidan, antiinflamasi, anti diabetes dan immunosupresi.²⁷⁻²⁹

Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan gram negative yang memiliki morfologi kokobasil atau batang pendek, tidak membentuk spora, bermotil dan dapat menghasilkan gas dari glukosa. *E. coli* memiliki ukuran 0,4 mm – 0,7 mm dan memiliki strain yang berkapsul.³⁰ Berdasarkan taksonominya *E. coli* diklasifikasikan sebagai berikut:³¹

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Divisi	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Escherichia coli dan sebagian besar bakteri enterik lainnya membentuk koloni yang sirkular, konveks, dan halus dengan tepi yang tegas.³⁰ *E. coli* tumbuh subur pada suhu antara 10-40°C, dengan suhu optimum 37°C, pH maksimum 9,0. Bakteri mampu meragi laktosa dengan cepat sehingga pada endo agar membentuk koloni merah muda sampai tua dengan kilat logam spesifik dan permukaan halus. Pada medium agar darah beberapa strain membentuk daerah hemolisis disekeliling koloni, bersifat organik dan kebanyakan dapat memfermentasi laktosa.³²

Escherichia coli secara khas menunjukkan hasil tes positif pada tes indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol, serta menghasilkan gas dari glukosa. Pada isolat dari urin dapat segera diidentifikasi sebagai *E.coli* dengan melihat hemolisinya pada agar darah, morfologi koloni yang khas dengan warna pelangi yang “berkilau” pada medium diferensial seperti agar EMB (eosine

methylene blue), dan tes bercak indol yang positif.³⁰

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian yang menggunakan studi eksploratif-deskriptif. Penelitian eksplorasi dengan cara mengisolasi bakteri endofit dari daun pegagan (*C. asiatica*).

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April - September 2017 Isolasi bakteri endofit, pengujian aktivitas antibakteri bakteri endofit terhadap *Escherichia coli* dan identifikasi bakteri endofit potensial akan dilakukan di Laboratorium Mikroskopis Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri endofit yang diisolasi dari daun pegagan (*C. asiatica*). Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat (mm) pertumbuhan *E. coli* yang diukur pada cawan petri. Variabel terkontrol pada penelitian ini

adalah waktu inkubasi, suhu inkubasi, sterilisasi alat dan bahan, media pertumbuhan dan pH media pertumbuhan.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Daun Pegagan

Daun pegagan (*C. asiatica*) didapatkan di Jl. Raya Transkalimantan, Kabupaten Kubu Raya. Sampel daun disimpan kedalam kantong plastik hitam untuk mengurangi penguapan selama perjalanan menuju tempat penelitian. Sampel kemudian dikumpulkan ke Laboratorium Mikroskopis Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.

Sterilisasi Permukaan Daun

Daun pegagan (*C. asiatica*) yang telah dikumpulkan, dicuci dibawah air mengalir selama 10 menit. Sterilisasi dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Daun direndam dalam alkohol 70% selama 1 menit, sambil dikocok pelan. Daun kemudian dicelupkan pada larutan NaOCL 1% selama 5 menit setelah itu dicelupkan lagi ke dalam

alkohol 70% selama 30 detik menggunakan pinset yang telah dilewatkan diatas nyala api terlebih dahulu. Daun dibilas menggunakan aquades steril selama 1 menit dan diulang dua kali.³³ Konfirmasi keberhasilan sterilasi permukaan daun dilakukan dengan menginokulasikan aquades pada bilasan terakhir pada media NA dengan menggunakan metode cawan sebar. Jika ditemukan pertumbuhan koloni pada media NA maka bakteri hasil isolasi tersebut bukanlah sepenuhnya bakteri endofit, sedangkan pada media NA yang tidak terdapat pertumbuhan koloni merupakan bakteri endofit.³³

Isolasi, Pemurnian dan Subkultur Bakteri Endofit

Daun pegagan (*C. asiatica*) yang telah disterilkan kemudian dikeringkan menggunakan kertas saring, selanjutnya dipotong kecil-kecil dengan ukuran 2 x 2 cm² menggunakan gunting bedah steril, pemotongan dilakukan didalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LFAC). Potongan daun cengkodok diinokulasikan pada media NA

yang telah ditambahkan agen antijamur yaitu nistatin 30ug/mL. Satu cawan petri diisi tiga sampai empat potongan daun. Setelah itu diinkubasi selama 1-2 hari. Bakteri yang tumbuh pada media NA dimurnikan berdasarkan penampakan morfologi koloni hingga didapatkan koloni tunggal.³⁴

Pengujian Potensi Antibakteri

Penyiapan Bakteri Uji

a. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Sebelum digunakan bakteri uji harus diremajakan dulu pada media pertumbuhannya. Satu koloni *E. coli* diambil menggunakan ose steril, kemudian diinokulasikan pada media pertumbuhan baru dengan cara menggoreskan pada permukaan agar, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah

24 jam, bakteri yang telah diinokulasikan dikonfirmasi menggunakan pewarnaan gram untuk mengetahui ciri-ciri dari bakteri uji tersebut. Peremajaan ini dilakukan karena dalam pengujian aktivitas antibakteri diperlukan koloni bakteri segar yang berusia 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dari hasil peremajaan digunakan untuk sampel penelitian.³⁵

a. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri uji yaitu koloni bakteri uji pada media peremajaan yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil menggunakan ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi larutan NaCl steril 0,9% sebanyak 5 mL. Kekeruhan yang terlihat kemudian disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ sel bakteri/mL, setelah setara maka

suspensi ini digunakan sebagai bakteri uji.³⁶

b. Pembuatan Larutan Mc Farland

Pembuatan larutan standar Mc Farland yaitu dengan menggunakan larutan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL. Larutan tersebut dicampurkan kemudian dikocok hingga homogen.³⁷

c. Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah siprofloksasin 5 µg/disk.³⁸

d. Uji Sensitivitas Antibiotik Siprofloksasin

Suspensi diambil sebanyak 100 µL dan diratakan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar*. Permukaan media diberi

disk antibiotik dan diinkubasi didalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Zona bening pada daerah sekitar antibiotik menunjukkan adanya daya hambat terhadap bakteri uji.³⁹

Skrining Bakteri yang Berpotensi sebagai Antibakteri

Produksi metabolit antibakteri dilakukan dengan metode isolat bakteri endofit yang tumbuh pada medium NA diinokulasikan pada media NB yang bertujuan untuk memproduksi metabolit antibakteri dari bakteri endofit. Isolat bakteri endofit diambil menggunakan jarum ose dan diinokulasikan kedalam tabung tabung reaksi 10 mL yang berisi media cair NB. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 hari dalam kondisi stasioner kemudian homogenisasi menggunakan vortex. Kemudian isolat diuji dengan metode

difusi cakram untuk uji terhadap bakteri patogen.⁴⁰

Biakan murni bakteri endofit yang diperoleh diuji potensi antibakterinya terhadap *E. coli* dengan metode *Paper Disc Agar Diffusion Technique*. Suspensi bakteri uji yang telah diukur kepadatannya kemudian disebar di permukaan media MHA dengan metode *swab*. Sebanyak 20 µL suspensi bakteri endofit hasil homogenisasi diserapkan pada cakram steril berdiameter 6 mm. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk.⁴¹

Pengukuran Diameter Zona Hambat

Pengamatan dan pengukuran zona hambat dilakukan setelah isolat bakteri endofit diinkubasi pada media MHA selama 24 jam. Aktivitas antibakteri bakteri endofit dapat dilihat dari terbentuknya zona bening disekitar cakram. Zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram (Gambar 3.2) diukur

diameter vertikal dan diameter horizontalnya dengan satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong.

Identifikasi Bakteri Endofit

Identifikasi bakteri endofit berdasarkan penampakan morfologi koloni, sel dan aktivitas biokimia. Pengamatan gambaran sel dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram. Aktivitas biokimia bakteri yang diamati meliputi kebutuhan oksigen, oksidase, katalase, fermentasi glukosa, fermentasi sukrosa, fermentasi laktosa, fermentasi mannitol, fermentasi maltose, urease, indol, sitrase, H₂S dan motilitas.

Pengumpulan Data

Data diperoleh dengan mengumpulkan semua hasil pengamatan isolat yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dari proses isolasi, pengujian antibakteri dan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk serta identifikasi bakteri endofit.

HASIL

Sterilisasi Permukaan Daun Pegagan

Hasil sterilisasi permukaan daun pegagan yaitu terdapat adanya pertumbuhan bakteri di sekitar daun pada petri yang berisi daun dan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada cawan petri konfirmasi keberhasilan sterilisasi daun. Tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri pada cawan petri konfirmasi membuktikan bahwa bakteri yang tumbuh disekitar daun merupakan bakteri endofit.

Isolasi Bakteri Endofit dari Daun Pegagan

Sebanyak 42 isolat dengan karakter morfologi koloni yang berbeda telah berhasil diisolasi dari daun pegagan.

Hasil Uji Kemurnian Bakteri Uji

Hasil uji Kemurnian Bakteri Uji *Escherichia coli* yaitu pada media NA menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri berbentuk bulat berwarna putih dengan tepian utuh dan pertumbuhan pada media

selektif diferensial EMB agar menunjukkan pertumbuhan koloni berwarna hijau metalik. Pengujian bakteri uji dilanjutkan dengan metode pewarnaan gram, berdasarkan pewarnaan gram bakteri tersebut merupakan gram negatif, berwarna merah dan berbentuk batang.

Hasil Uji Aktivitas Bakteri Endofit

Hasil uji aktivitas bakteri endofit daun pegagan terhadap *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi cakram (*disc diffusion methods*) untuk mengetahui aktivitas zona hambat dari bakteri endofit. Hasil pengujian aktivitas bakteri endofit daun cengkodok terhadap *Escherichia coli* didapatkan sebanyak 4 isolat bakteri endofit dari 42 isolat memiliki aktivitas terhadap *E. coli*. Aktivitas isolat bakteri endofit berkisar antara 2 mm – 6,5 mm (aktivitas lemah-sedang).

PEMBAHASAN

Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Daun pegagan digunakan sebagai sampel penelitian. Pengambilan daun dilakukan di jalan Khatulistiwa Kecamatan Pontianak timur Kota Pontianak. Daun pegagan tumbuh dibawah pohon dan terletak ditepi jalan. Daun pegagan diambil pada pagi hari sekitar pukul 08.00-10.00 WIB sebanyak 12 helai. Daun yang dipilih dalam kondisi segar, berwarna hijau, tidak layu, tidak ada kerusakan pada daun dan tanaman yang sehat tidak tampak tanda penyakit, hal ini mengindikasikan bahwa bakteri yang didapatkan merupakan bakteri bakteri endofit bukan patogen¹²

Sterilisasi Permukaan Daun

Sampel yang telah di ambil akan dilakukan sterilisasi permukaan daun. Sterilisasi permukaan daun bertujuan untuk menghilangkan bakteri yang berada dipermukaan daun. Daun dibersihkan dengan air mengalir kemudian bagian daun dipotong dengan ukuran 2cm x 2cm.

Daun yang telah di potong kemudia dilakukan sterilisasi dengan cara dimasukan kedalam larutan alkohol 70% selama 1 menit. Alkohol berfungsi untuk mendenaturiasi protein bakteri.⁴²

Selanjutnya dimasukan ke dalam larutan 1% sodium hypochlorite (NaOCl) selama 5 menit. Ketika senyawa NaClO dilarutkan dalam air maka garam hipokloritnya akan membentuk senyawa HClO, yaitu senyawa yang dapat menyebabkan kerusakan DNA yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian sel bakteri.⁴³ Setelah daun dimasukan kedalam NaOCl daun direndam di alkohol 70 % selama 1 menit. Pada tahap akhir sterilisasi daun, sampel dibilas 3 kali dengan aquades steril. sebanyak 100 µL aquades bilasan terakhir diinokulasikan pada medium NA dengan menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*). Sedangkan daun yang telah steril diletakan pada cawan petri. Kemudian di inkusikan selama 24- 48 jam. Hasil inkubasi selama 24-48 jam tidak ditemukan adanya pertumbuhan

bakteri pada cawan petri konfirmasi. Tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri pada cawan petri konfirmasi membuktikan bahwa bakteri yang tumbuh disekitar daun merupakan bakteri endofit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Munif dan Hipi bahwa bakteri yang tumbuh pada cawan petri konfirmasi merupakan acuan bahwa bakteri yang tumbuh disekitar daun tersebut bukan bakteri endofit.⁴⁴

Isolasi dan Pemurnian Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup dalam jaringan tanaman yang dapat diisolasi melalui sterilisasi permukaan jaringan.⁴⁵ Jumlah bakteri endofit di dalam tanaman tidak dapat ditentukan secara pasti, namun bakteri ini dapat dideteksi dengan mengisolasi pada media agar.⁴⁶

Bakteri endofit diisolasi dari tanaman pegagan melalui sterilisasi permukaan. Daun yang telah steril diletakan di media NA dan ditemukan adanya bakteri endofit pada media NA.

Penggunaan media NA lebih cocok untuk isolasi bakteri endofit dan ditambahkan nistatin sebagai antifungi.^{27,47} Bakteri endofit endofit yang tumbuh pada media NA yang secara makroskopis berbeda dianggap merupakan isolat yang berbeda, namun jika koloni bakteri endofit yang tumbuh di media pertumbuhan yang secara makroskopis sama dianggap isolat yang sama. Bakteri endofit yang berbeda kemudian dilakukan pemurnian. Tujuan pemurnian isolat bakteri endofit adalah untuk memisahkan hasil inokulasi yang terdiri dari banyak koloni yang berlainan jenis sehingga didapatkan koloni murni pada setiap cawan petri. Setiap koloni dengan morfologi yang berbeda dipisahkan menjadi isolat tunggal hingga diperoleh isolat murni yaitu isolat yang hanya mengandung satu bentuk morfologi yang sama.⁴⁸ Dari hasil setiap bakteri yang dimurnikan didapatkan 42 isolat bakteri endofit. Setiap isolat memiliki karakteristik masing-masing.

Uji Kemurnian Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli*. Secara makroskopis, pada media NA bakteri berbentuk sirkular berwarna putih dengan tepian utuh dan konveks. Berdasarkan literatur yang di dapatkan bahwa *E. coli* memiliki koloni berbentuk sirkular, konveks, dan tepi yang tegas.⁴⁹ Sedangkan Secara mikroskopis bakteri tersebut merupakan gram negatif, berbentuk batang dan berwarna merah. Bakteri *E. coli* berwarna merah disebabkan rusaknya lapisan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri yang tidak tahan oleh pencucian alkohol, sehingga warna cat awal yang merupakan kompleks kristal violet-iodin luntur dan warna cat Gram yang berwarna merah mampu menyelimuti dinding peptidoglikan pada bakteri *E. Coli*.³² Identifikasi bakteri uji dilanjutkan menggunakan media EMBA (Eosin Methylene Blue Agar) yaitu media selektif yang digunakan untuk mengisolasi *escherichia coli*. Pada media EMBA *E.*

Coli tumbuh berwarna hijau metalik dengan pusat berwarna gelap.⁵⁰ Uji kemurnian ini dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri uji yang digunakan merupakan bakteri uji yang benar-benar murni tanpa adanya kontaminasi. Uji kemurnian bakteri patogen dilakukan sebelum bakteri uji digunakan untuk tahapan skrining bakteri endofit.

Uji Aktivitas Bakteri Endofit

Isolat yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri endofit terlebih dahulu di fermentasikan. Fermentasi bertujuan untuk menghasilkan sel bakteri endofit dalam jumlah yang banyak sehingga senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan menjadi lebih optimal. Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini adalah media NB (*Nutrient Broth*). Proses fermentasi menggunakan media cair karena lebih efektif untuk memproduksi biomassa dan senyawa bioaktif dibandingkan fermentasi dengan media padat.⁵¹ Proses fermentasian ini dilakukan

pada suhu ruang selama 72 jam. Hasil fermentasi yang diperoleh kemudian di *vortex* untuk mendapatkan suspensi yang homogen.²⁵ Sebelum melakukan pengujian aktivitas bakteri endofit, bakteri uji dan bakteri endofit terlebih dahulu disetarakan dengan kekeruhan larutan Mc Farland 0,5. Tujuan disamakannya kepadatan bakteri uji setara larutan standar Mc Farland II adalah untuk mendapatkan kepadatan bakteri uji yang sama.⁵²

Berdasarkan uji aktivitas bakteri endofit yang telah dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Isolat bakteri endofit memberikan efek zona hambat/bening terhadap bakteri *Escherichia coli*. Berdasarkan tabel 4.2 terdapat 4 isolat aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Masing masing isolat memiliki zona hambat, isolat 16 memiliki zona hambat sebesar 6,5 mm, isolat 36 memiliki zona hambat sebesar 4,5 mm, isolat 26 dan 30 memiliki zona hambat sebesar 2 mm. hal ini menunjukkan bahwa bakteri endofit

dari daun pegagan mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai antibakteri dikarenakan bakteri endofit tersebut memiliki metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya.⁵³ Terdapat 38 isolat yang tidak menghasilkan zona hambat pada isolat bakteri endofit nomor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 41 dan 42. Sedangkan kontrol positif pada penelitian memiliki zona hambat sebesar 39 mm. Faktor yang mempengaruhi ukuran daerah penghambatan, yaitu tingkat sensitifitas dari organisme uji, medium kultur dan kondisi inkubasi, kecepatan difusi dari senyawa antibakteri dan konsentrasi senyawa antibakteri.⁵⁴

terbentuknya zona hambat juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan bakteri uji yang berlebihan sehingga pengaruh metabolit yang dihasilkan oleh bakteri endofit tidak signifikan terhadap pertumbuhan bakteri uji.⁵⁵ besar kecilnya zona daya hambat mikrob endofit terhadap

bakteri patogen diduga disebabkan oleh metabolit yang dihasilkan oleh isolat. Semakin tinggi konsentrasi antibakteri yang dihasilkan maka semakin tinggi pula daya hambatnya yang ditunjukkan oleh kecilnya pertumbuhan koloni bakteri patogen.⁵⁶

Isolat bakteri endofit yang diperoleh dari *Centella asiatica* L. memiliki potensi sebagai antibakteri yang ditandai dengan terbentuknya diameter zona hambat, namun terdapat beberapa isolat bakteri endofit yang tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji.

KESIMPULAN

Sebanyak 42 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari daun pegagan (*Centella asiatica*). Empat isolat memiliki aktivitas terhadap *Escherichia coli* dengan kisaran 2 mm – 6,5 mm (aktivitas lemah – sedang). Isolat 16 merupakan isolat dengan aktivitas paling tinggi yang berhasil diisolasi dari daun pegagan yaitu memiliki aktivitas sebesar 6,5 mm.

Identifikasi lebih lanjut menggunakan teknik molecular dengan penanda gen 16 S rRNA

DAFTAR PUSTAKA

- Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscaizo J, et al. Harrison's Internal Medicine. 19th Edition. USA. McGraw – Hill; 2015.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) Profil data kesehatan Indonesia tahun 2015. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI; 2016.
- Profil Dinas Kesehatan Kota Pontianak. Kasus Diare, Seksi Pengendalian Penyakit, Dinas Kesehatan Kota Pontianak. Pontianak; 2015
- Kitaoka M, Miyata ST, Unterweger D, Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *vibrio cholerae*. J of Med Microbiol. 2011;60(4):297-407
- Permenkes RI. Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik, Kementrian Kesehatan RI. Jakarta; 2011
- Akbar M, Budiarti LY, Edyson. Perbandingan efektivitas antibakteri antara ekstrak metanol kulit batang kasturi dengan ampicilin terhadap *Staphylococcus aureus* in Vitro. Jurnal Berkala Kedokteran, 2016;12(1): 1-9.
- Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine. Erlangen-Nuremberg. 2000;7(5):427-488
- Dalimartha, S. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid 2. Jakarta: Trubus Agriwidya; 2008. (cited 2016 Des 23) Available from; https://books.Google.co.id/books?id=vmrbQE4jfYcC&printsec=frontcover&hl=id&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine. Erlangen-Nuremberg. 2000;7(5):427-488
- Panthi,MP, Chaudhary,RP Antibacterial activity of some selected folklore medicinal plants from West Nepal. Scientific world. 2006;4(4):16-21.
- Pratiwi BE. Isolasi dan skrining fitokimia Bakteri Endofit dari daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri [skripsi]. Jakarta. UIN; 2015.
- Bhore SJ, Sathisha G. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin-like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. World J. Agric. Sci. 2010;6(4):345-352.
- Barbara JES, Christine JCB. 2006. What are Endophytes. In Microbial Root Endophytes (Eds: Thomas N. Sieber). Springer-Verlag, Berlin.
- Altahi, AD. Plasmid profiles, antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.), African J. of Biotech. 2009;8(21):5873-5882.
- Vega FE, Ripoll M, Posada F, Buyer JS. Endophytic bacteria in *Coffea Arabica* L. J. Basic. Microbiol, 2005;45:371-380
- Castillo U, et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiology Letters. 2003;224:180-190
- Guan SH, Sattler I, Lin WH, Guo DA, Grabley S. p-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subspecies. J Nat Prod. 2005;68:1198–200
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications Mini Review. FEMS Microbiol Lett. 2008;(278):1–9.
- Nursulistyarini F. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Penghasil Antibakteri dari daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) steenis) [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Negeri Sunan Kalijaga; 2014
- ITIS Report Taxonomic Hierarchy *Centella asiatica* L. Urban. L. Urb, Taxonomic Serial, No:29612(internet). 2017 (Updated 2016 Des 6; Cited 2016 Des 6. Available from: http://www.itis.govservlet/SingleRpt/SingleRpt?Search_topic=TSN&searchvalue=29612
- Singh S, Gautam A, Sharma A, Batra A. *Centella asiatica* (L.): a plant with immense medicinal potential but threatened. Intl J of Pharma Sci Rev and Res. 2010;4(2):1-9
- Rohyani IS, Aryanti E, Suropto. Kandungan fitokimia beberapa jenis tumbuhan lokal yang sering dimanfaatkan sebagai bahan baku obat di Pulau Lombok. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon. 2015;1(2):388-391
- Direktorat Obat Asli Indonesia, Serial data ilmiah terkini tumbuhan obat pegagan

- Centella asiatica* (L.) Urban. Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2010: 23
24. Seevaratnam V, Banumathi P, Premalatha MR, Sundaram SP, Arumugam, T et al. Functional properties of *Centella asiatica* (L.): A review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4(5): 8-14.
 25. Simarmata R, Lekatompessy S, Sukiman H. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berk Penel Hayati*. 2007; 13: 85-90.
 26. Tanaka M, Sukiman H, Takebayashi M, Saito K, Suto M, Prana MS, et al. Isolation, screening and phylogenetic identification of endophytes from plants in Hokaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environment*. 1999; 14(4):237–41.
 27. Kumala S, Siswanto EB. Isolation and screening of endophytic microbes from *Morinda citrifolia* and their ability to produce anti-microbial substances. *Microbiol. Indonesia*. 2007; 1(3): 145-148.
 28. Harni R. Studi bakteri endofit untuk mengendalikan nematoda peluka akar (*Pratylenchus brachyurus* [Godfrey] Filipjev & Stekhoven) pada tanaman nilam. Disertasi. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 2010.
 29. Rahmawati D. Formulasi krim minyak atsiri rimpang temu giring (*Curcuma heyneana val & zipp*): uji sifat fisik dan daya antijamur terhadap *Candida albicans* secara in vitro. Disertasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2009.
 30. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. *Enterotoxigenic Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:465-83.
 31. Songer JG, Post KW. *Veterinary Microbiology: Bacterial and fungal agents of animal disease*. Elsevier Saunders: Missouri; 2005.
 32. Tortora G, Funke BR, Case CL. *Introduction to Microbiology*. 2007.
 33. Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(9): 5603-8.
 34. Anjum N, Chandra R. Endophytic bacteria optimizat on of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian J of Pharm and Clin Res*. 2015; 8(4): 233-8.
 35. Schwalbe R, Steele ML, Goodwin AC. Antimicrobial susceptibility testing protocols. United States of America: Crc Press; 2007; 53-91.
 36. Indian Council of Medical Research. Detection of antimicrobial resistance in common gram negative and gram positive bacteria encountered in infectious disease-an update. *ICMR Bulletin*. 2009; 39(1):1-20
 37. Sutton S. Determination of inoculum for microbiological testing. *microbiology topics*. *Journal of GXP Compliance*. 2011; 15(13): 49-53.
 38. Cockerill FR. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first information supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2010;31(1): 46.
 39. Elliott WT. *Buku mikrobiologi kedokteran dan infeksi*. Edisi 4. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. 2013.
 40. Priyanto Simarmata, Rumella, Sylvia L, Harmastini S. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berk Penel Hayati*. 2007; 13: 85-90.
 41. Priharta AAYD. Isolasi dan identifikasi bakteri endofit dalam batang tanaman *Artemisia annua* L. yang diuji potensi antibakterinya terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. [Skripsi] Yogyakarta. USD; 2008.
 42. Parija, SC. *Textbook of microbiology & immunology*. India: Elsevier; 2009.
 43. Dukan, S., S. Belkin, and D. Touati. 1999. Reactive oxygen species are partially involved in the bactericidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys*. 367: 311–316
 44. Munif A, Hipi A. Potensi bakteri endofit dan rizosfer dalam meningkatkan pertumbuhan jagung. Bogor: Seminar National Serelia, IPB; 2011.
 45. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol*. 43:895-914.
 46. Bacon CW, Hinton SS. The use of *Bacillus subtilis* as an endophyte for control of corn seeding blight disease caused by *Fusarium moniliforme*. *USDA. ARS*. 2006.
 47. Sulistiyani TR. 2014. Keragaman bakteri endofit tanaman kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) dan toksisitasnya terhadap embrio ikan zebra. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
 48. Pelczar MJ, Chan ECS. *Dasar-dasar mikrobiologi jilid I*. Jakarta: UI Press. 2008; 489-93.
 49. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 27th ed. USA: The McGraw-Hill; 2016
 50. Baehaqi, K. Y., Putriningsih, P. A. S., & Suardana, I. W. (2015). Isolasi dan

- Identifikasi *Escherichia Coli* O157: H7 pada Sapi Bali Di Abiansema, Badung, Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(3).
51. Pratiwi, Sylvia T. Mikrobiologi farmasi. Jakarta: penerbit Erlangga. 2008.
 52. Koneman EW. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1531
 53. Radji, M. (2012). Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 2(3).113-126
 54. Prescott LM, Harley JP. Laboratory Exercises In Microbiology. McGraw-Hill Science 2002.
 55. Strobel, G. A. (2002). Microbial gifts from rain forests. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(1), 14-20.
 56. Sunariasih, Ni Putu Linda, I Ketut Suada, Ni Wayan Suniti. Identifikasi jamur endofit dari biji padi dan uji daya hambatnya terhadap *Pyricularia oryzae* Cav. E-jurnal agroteknologi tropika Vol.3 (2). Denpasar: Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana. 2014.